CE 0483

SeroELISA™ Chlamydia IgG

Dosage par la Méthode ELISA (ELISA) destiné à détecter les anticorps IgG spécifiques dirigés contre les ***Chlamydiae*** présents dans le sérum humain

Mode d'Emploi

Trousse de test prévue pour 96 déterminations
(N° 111-01 du Catalogue)

Destiné au Diagnostic in Vitro
Pour usage professionnel uniquement
A conserver entre 2 et 8°C.
Ne pas congeler

***Savyon*® Diagnostics Ltd.**
3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL
Tel: +972.8.8562920
Fax: +972.8.8523176
E-Mail: support@savyondiagnostics.com

Usage Prévu

La trousse du test SeroELISA™ des IgG anti-Chlamydia est conçue pour la détermination des anticorps IgG spécifiques dirigés contre les Chlamydiae présents dans un seul échantillon de sérum humain ou pour évaluer des sérums appariés, à l'aide d'un dosage par la méthode ELISA.

Destiné au Diagnostic *In Vitro*.

Introduction

Chlamydia est une bactérie intracellulaire obligatoire gram négatif responsable de pathologies aiguës et chroniques chez les mammifères et les espèces aviaires. Le genre Chlamydia est composé de quatre espèces : *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* et *C. pecorum*.

C. trachomatis se divise en 15 sérotypes (1). Les sérotypes A, B, Ba et C sont les agents du trachome (2), le facteur responsable de la cécité endémique, qui peut être prévenue et qui sévit dans les pays du tiers monde. Les sérotypes L_1-L_3 sont les agents du lymphogranuloma venereum. Les sérotypes D-K sont la cause la plus fréquente de l'infection génitale sexuellement transmissible à travers le monde : cervicite, endométrite/salpingite (3) chez la femme et uréthrite (4) chez l'homme et chez la femme. Les endométrites/salpingites peuvent induire une occlusion tubaire associée à un risque supérieur de grossesse extra utérine et d'infertilité. L'infection génitale peut être responsable d'une infection aiguë et persistante éventuellement sans aucun symptôme clinique. Généralement, ces infections peuvent être traitées dès qu'elles sont diagnostiquées. Toutefois, en absence de tout traitement l'infection peut évoluer vers une inflammation chronique sévère conduisant à une infertilité, à une grossesse ectopique, à des avortements à répétition et à des naissances prématurées. De plus, les nourrissons de mères infectées peuvent contracter l'infection lors de la naissance, ce qui peut conduire à des conjonctivites ou à des pneumonies (5).
C. pneumoniae est, chez l'homme, un agent pathogène des voies respiratoires important qui est responsable de plus de 10% des cas de pneumonies communautaires. On a montré que cette bactérie était associée à des maladies respiratoires aiguës, à la pneumonie, à l'asthme, aux bronchites, aux pharyngites, au syndrome pulmonaire aigu de la drépanocytose, à l'insuffisance coronarienne, et au syndrome de Guillain-Barre (6).

C.psittaci affecte une grande variété d'espèces hôtes, allant des mollusques aux oiseaux et aux mammifères,et provoque aussi des pneumonies sévères.

Des tests de sérodiagnostic, qui reposent sur des marqueurs immunologiques spécifiques, servent d'outil de diagnostic non-invasif pour identifier à la fois les infections distales et les infections profondes (7). On a mis en évidence que des titres élevés d'anticorps IgG anti-Chlamydia étaient le signe d'une infection active à chlamydiae (3, 8).
Des taux élevés d'anticorps IgG anti-Chlamydia ont une valeur diagnostique dans les infections chroniques ou systémiques telles que les salpingites, l'infertilité mécanique, la périhépatite, l'épididymite, le syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter et la pneumopathie (3, 9, 10).
Les Laboratoires Savyon Diagnostics ont mis au point un dosage par la méthode ELISA qui permet de détecter des anticorps IgG spécifiques dirigés contre Chlamydia.

Le test SeroELISA™ permettant de déceler Chlamydia est fondé sur le sérotype L_2 de *C. trachomatis* à large réactivité antigénique. Il permettra de détecter les anticorps de *C. trachomatis*, *C. psittaci* et *C. pneumoniae* (TWAR).

Principe du Test

- Le sérum humain à analyser est mis en contact avec la substance antigénique dont sont revêtus les puits de microtitration. L'anticorps spécifique, lorsqu'il est présent dans le sérum du patient, se lie à l'antigène fixé, un complexe se forme et tous les composants sériques non spécifiques sont éliminés par lavage dans la phase de lavage.
- De la peroxydase de raifort (PR) conjuguée à des IgG anti-humaines (spécifiques de la chaîne γ) est ajoutée dans les puits. Si au

cours de l'étape précédente un complexe antigène-anticorps s'est formé, l'anticorps conjugué à la peroxydase se liera à la portion de l'anticorps du complexe. Si au cours de l'étape précédente, il ne s'est pas formé de complexe antigène-anticorps, le conjugué est éliminé par lavage dans la phase de lavage.

- Du substrat TMB est ajouté. Une réaction positive est signalée par une couleur allant du bleu au bleu profond qui se développe dans les puits du test à la suite de la réaction enzymatique de la portion de la peroxydase avec le peroxyde et le réactif du chromogène. Ensuite la réaction enzymatique est arrêtée par adjonction d'une solution acide. L'absorption des puits du test est déterminée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- L'absorption à 450 nm donne des indications sur le titre des IgG anti-Chlamydia présentes dans les échantillons sériques des patients.

Technique de Dosage

1. Antigène de Chlamydia Fixé à la Phase Solide (Ag)	+	Sérum réagissant positivement aux IgG Anti-Chlamydia (Ab_1)

↓



Complexe $AgAb_1$

2. Complexe $AgAb_1$	+	IgG (Ab_2) anti-humaines conjuguées à la PR

↓



Complexe $AgAb_1Ab_2$

3. Complexe $AgAb_1Ab_2$	+	Substrat TMB



Solution Bleue

↓ ← Solution d'Arrêt du Chromogène

Solution Jaune (Détermination de l'Absorption à 450 nm)

Avertissement et Précautions

- **Avertissement:** LA SUBSTANCE ANTIGENIQUE DE CHLAMYDIA A ETE INACTIVEE ET NE CONTIENT PAS D'ORGANISMES VIVANTS DETECTABLES. TOUTEFOIS, IL FAUT MANIPULER ET ELIMINER LES BARRETTES COMME S'IL S'AGISSAIT D'UN MATERIEL DE LABORATOIRE POTENTIELLEMENT DANGEREUX SUR LE PLAN BIOLOGIQUE.
- **Précautions:** Ce kit contient des sérums humains qui ont été testés par des techniques approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) –Ils ont été trouvés dépourvus d'antigène HBs,d'ac VIH 1 et 2, et anti HCV ,comme aucune technique ne peux garantir l'innocuité absolue des matériels testés ,ceux-ci doivent donc être manipulés comme potentiellement infectieux- selon les recommandations publiées dans le manuel « Sécurité biologique dans les laboratoires de microbiologie et de biologie médicale, 1988 » de CDC/NIH (National Institute of Health - Institut National de la Santé américain).
- La Solution de Substrat/Chromogène est un produit irritant pour la peau et les muqueuses. Eviter tout contact direct.
- **Destiné au Diagnostic *In-vitro***.

Contenu de la Trousse

1. Plaque pour microtitration préalablement enduite (96 puits par unité). Chaque sachet contient une plaque de microtitration comprenant 12 barrettes amovibles dans un cadre en plastique. Chaque barrette est enduite d'antigènes de Chlamydia.
   1 Unité
2. Témoin Positif (sérum humain positif vis-à-vis des anticorps IgG anti-Chlamydia). Prêt à l'emploi.
   1 Fiole, 2,0ml
3. Témoin Faiblement Positif (sérum humain faiblement positif vis-à-vis des anticorps IgG anti-Chlamydia). Prêt à l'emploi.
   1 Fiole, 2,0ml
4. Témoin négatif (Sérum humain négatif vis-à-vis des anticorps IgG anti-Chlamydia). Prêt à l'emploi.
   1 Fiole, 2,0ml
5. IgG Anti-Humaines Conjuguées à de la PR (spécifiques de la chaîne γ) Prêt à l'emploi.
   1 Fiole, 10ml
6. Diluant pour Sérum, Prêt à l'emploi.
   1 Flacon, 40ml
7. Tampon de Lavage Concentré (x20).
   1 Flacon, 100ml
8. Substrat TMB, Prêt à l'emploi.
   1 Fiole, 14ml
9. Solution d'arrêt (1M H_2S0_4), Prête à l'emploi.
   1 Flacon, 15ml
10. Couvercle de Plaque. **1 Unité**
11. Mode d'Emploi. **1**

Matériel Nécessaire mais Non Fourni

1. Tubes à essais et portoirs pour effectuer les dilutions des sérums de patients.
2. Micropipettes réglables ou pipettes multicanaux (gammes de 5-50, 50-200 et 200-1000µl) et embouts jetables.
3. Pipettes en plastique jetables (tailles assorties) et dispositifs de sécurité pour pipeter.
4. Une fiole jaugée d'un litre.
5. Une éprouvette graduée de 50ml.
6. Un laveur ou un flacon de lavage pour les plaques ELISA.
7. Serviettes en papier ou papier absorbant.
8. Un mélangeur Vortex.

9. Un bain-marie à 37°C équipé d'un couvercle, ou une chambre humide placée dans un incubateur à 37° ± 1°C.
10. Lecteur de test ELISA équipé d'un filtre de 450 nm.
11. Eau distillée ou désionisée pour la dilution du Tampon de Lavage Concentré.

Conservation et Durée de Conservation des Réactifs

Tous les produits fournis doivent être conservés entre 2° et 8°C. S'ils sont conservés entre 2°et 8°C les réactifs du test sont stables jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'emballage de la trousse. Une exposition des composants qui au départ étaient scellés ou dotés d'un bouchon à la température ambiante pendant quelques heures n'endommagera pas les réactifs. **NE PAS CONGELER!**
Lorsqu'une trousse est entamée, la durée de conservation du produit d'origine est de 60 jours à partir du premier jour d'ouverture. Une fois ouvert, le sachet en papier d'aluminium contenant les barrettes doit être scellé avec une bande adhésive. Il ne faut pas retirer le petit paquet de produit déshydratant.

Collecte des Echantillons

Il faut prélever les échantillons de sérum de façon aseptique et les conserver entre 2° et 8°C en présence d'azoture de sodium 0,05% (NaN_3) comme conservateur au cas où ils devraient être analysés quelques jours plus tard. Pour des périodes plus longues, il faut conserver des fractions aliquotes des échantillons de sérum à -20°C.
Il est fortement conseillé de tester des échantillons sériques limpides et non hémolysés car ils sont susceptibles de donner des résultats moins reproductibles.

Technique de Dosage

Remarques :

a) Les composants de cette trousse ont été testés comme formant une unité indissociable. Ne pas mélanger les composants issus de différents lots de trousses ou de trousses provenant d'autres fabricants.
b) La température de tous les réactifs doit être équilibrée avec la température ambiante avant leur utilisation. Le Diluant pour Sérum et le Diluant pour Conjugué deviennent gélatineux lorsqu'ils sont réfrigérés. Si cela s'avère nécessaire, il est possible d'accélérer la liquéfaction en chauffant ces composants à 37°C pendant plusieurs minutes.
Des cristaux de sel peuvent se former dans le Tampon de Lavage Concentré lorsque celui-ci est conservé entre 2° et 8°C. Il faut dissoudre de nouveau complètement ces cristaux en les chauffant à 37°C avant la dilution.
c) Ne pas réaliser le test en présence de vapeurs réactives (par exemple des vapeurs se dégageant de substances acides, alcalines ou aldéhydiques) ou de poussière, dans la mesure où l'activité enzymatique des IgG Anti-Humain conjuguées à la PR peut être affectée.
d) Ne pas toucher la surface des barrettes. Ne pas toucher les bords des puits avec les embouts de la pipette au moment de distribuer les réactifs.
e) Utiliser des pipettes à embouts jetables. Eviter la contamination croisée entre les réactifs.
f) Tapoter sur la surface du flacon pour libérer le liquide qui pourrait être retenu dans le bouchon.
g) Eviter de piéger des bulles d'air dans les puits.
h) Répartir les liquides lentement afin d'éviter toute projection.
i) Les sérums du Témoin Positif, du Témoin Faiblement Positif et du Témoin Négatif doivent être traités avec les échantillons de sérums à chaque fois que le test est réalisé.
j) A chaque test, il faut consacrer un puits par test pour disposer d'une valeur de blanc.
k) Toutes les étapes de la technique doivent être réalisées séquentiellement sans interruption.

Technique du Test – Manuelle

Procédure sur automate disponible sur demande

A) Lavage des Barrettes

Il est recommandé de procéder à un prélavage des barrettes mais celui-ci n'est pas obligatoire. Dans tous les cas, il faut humidifier les barrettes à l'aide d'une solution de Tampon de Lavage avant d'appliquer les échantillons à tester et les égoutter en les tapotant au-dessus de papier absorbant avant de procéder au test.
Si le laveur automatique pour les plaques à ELISA est inutilisable il convient de réaliser la technique comme suit :

1. Retirer le nombre requis de barrettes de leurs sachets en papier d'aluminium et insérez les dans le cadre de la plaque.
2. Diluer le tampon de Lavage Concentré (1:20) au vingtième avec de l'eau distillée.
Par Exemple: Pour une barrette préparer 100ml de Tampon de Lavage (5ml de Tampon de Lavage Concentré avec 95ml d'eau distillée). Agiter doucement pendant 20 minutes.
Il faut préparer une solution de travail à base de tampon de lavage avant l'emploi et jeter l'excédent.
3. Après incubation remplir chaque puits jusqu'à la moitié avec de la solution de Tampon de Lavage.
4. Laisser tremper pendant 2 minutes, puis jeter le contenu des puits. Répéter ces étapes **cinq** fois.
5. Egoutter la surface des barrettes et du cadre en les tapotant doucement au-dessus de papier absorbant.
Le lavage complet des puits après l'incubation est une étape essentielle pour obtenir des résultats optimum. Il ne faut pas laisser de traces de Tampon de Lavage dans les puits.

B) Incubation des Echantillons de Sérum et des Témoins

6. Diluer chaque sérum de patient au 1:256 avec du Diluant pour Sérum comme suit :
   1:16 -Ajouter 10µl de sérum de patient à 150µl de Diluant pour Sérum
   1:256 -Ajouter 10µl de la dilution au1:16 à150µl de Diluant pour Sérum
   Les **Témoins** sont fournis sous forme de réactifs prêts à l'emploi et il est inutile de les diluer.
7. Déposer à la pipette 50µl de Témoin Positif, de Témoin Faiblement Positif et de Témoin Négatif prêts à l'emploi et de la dilution au 1:256 du sérum de patient dans des puits distincts correspondants des barrettes de test.
   Déposer à la pipette 50µl de Diluant pour Sérum dans un puits pour avoir la valeur du blanc.
   La distribution à la pipette des témoins et des échantillons de sérum dans les puits ne doit pas durer plus de 10 minutes.
8. Couvrir les barrettes avec un couvercle de plaque et mettre à incuber pendant 30 minutes à 37ºC dans une chambre humide.
9. Jeter le liquide contenu dans les puits. Laver les puits **cinq** fois et égoutter les comme dans les étapes A) 3-5.

C) Incubation en présence de Conjugué

10. Déposer à la pipette de 50µl de solution de travail d'IgG Anti-Humaines conjuguées à la PR dans chaque puits.
11. Couvrir les barrettes avec un couvercle de plaque et mettre à incuber pendant 30 minutes à 37ºC dans une chambre humide.
12. Jeter le liquide contenu dans les puits, laver les **cinq** fois et égoutter les comme dans les étapes A) 3-5.

D) Incubation en présence de Substrat-TMB

13. Déposer à la pipette 100µl de Substrat-TMB dans chaque puits.
14. Couvrir les barrettes avec un couvercle de plaque et mettre à incuber à température ambiante pendant 15 minutes.
15. Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl d'une solution d'arrêt pour chromogène dans chaque puits.
    Déposer la solution d'arrêt pour chromogène selon la même séquence et en respectant les mêmes intervalles de temps que pour le Substrat-TMB dans l'étape D15.
16. Etalonner le spectrophotomètre sur le puits contenant le blanc. Déterminer l'absorption à 450nm et enregistrer les résultats.
    Il est recommandé de déterminer l'absorption immédiatement mais ce n'est pas obligatoire. La détermination de l'absorption ne doit pas durer plus de 30 minutes, après l'arrêt de la réaction du chromogène.

Critères d'acceptabilité du Test

Le test est valide si:

- L'absorption du Témoin Positif est ≥ 0,8 à 450nm
- L'absorption du Témoin Faiblement Positif est ≥ 0,4 à 450nm
- L'absorption du Témoin Négatif est ≤ 0,15 à 450nm

Si ces conditions ne sont pas remplies, le test n'est pas valide et doit être réalisé de nouveau.

Calcul de la Valeur Seuil (CVS)

La valeur seuil se calcule selon la formule suivante :

$$CVS = 0{,}154 \times (Pc - Nc) + Nc$$

Pc = Absorption du Témoin Positif à 450 nm
Nc = Absorption du Témoin Négatif à 450 nm

Interprétation des Résultats du Test

Absorption à 450nm	Interprétation des Résultats	Titre d'IgG anti-Chlamydia estimé
Inférieur au CVS – 0,03	Négatif	<256
CVS ± 0,03	Equivoque*	256
Au-dessus du CVS +0,03 Jusqu'au Témoin Faiblement Positif	Faiblement Positif	256-512
Au-dessus du Témoin Faiblement Positif jusqu'au Témoin Positif	Positif	1024-2048
Au-dessus du Témoin Positif	Hautement Positif	≥2048

* Tester de nouveau les échantillons de sérum qualifiés d'équivoques. Si le résultat est de nouveau équivoque, il est recommandé de tester un autre échantillon de ce sérum.

Valeur Significative des Résultats

L'expérience clinique et des études récentes indiquent que des taux élevés d'anticorps IgG dirigés contre Chlamydia peuvent servir de marqueur pour une infection active ou chronique par Chlamydia.

Détermination du Titre Final

Pour le suivi du profil immunitaire d'un patient, il faut comparer les échantillons de sérum prélevés pendant la phase aiguë et pendant la convalescence. Un titrage de sérums appariés doit être réalisé avec les deux échantillons de sérum testés dans la même série. La dilution la plus élevée de sérum ayant l'absorption au-dessus de la valeur seuil du test est le **titre final**.

Limites du Dosage

- Un test sérologique unique ne peut être utilisé comme seul critère de diagnostic. Toutes les données cliniques et biologiques doivent être prises en compte.
- Le test est un test ELISA à un seul sérotype (L_2). L_2 comprend des déterminants antigéniques qui existent dans les sérotypes de *Chlamydia trachomatis* ainsi que l'antigène du groupe. Des anticorps dirigés contre *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) et *Acinetobacter calcoaceticus* peuvent être détectés par ce test ELISA.
- La valeur significative des titres des échantillons doit être considérée en regard des caractéristiques de la population qui est analysée. Ces caractéristiques engloberont entre autres facteurs, l'âge, la situation géographique et le comportement sexuel.
- Ce test ne fournira pas d'indications sur le site de(s l')infection(s) par chlamydia(s). Il n'est pas supposé remplacer l'isolement sur culture cellulaire, si celui-ci est disponible.
- L'absence d'anticorps sériques mesurables n'exclut pas de manière définitive le risque d'une infection à chlamydiae.
- Un sérum contaminé par des bactéries ou un sérum hyperlipémique peut donner lieu à des résultats erronés.

Caractéristiques des Performances

On a comparé le test SeroELISA™ pour IgG anti-Chlamydia au test IPAzyme™ pour IgG/IgA anti-Chlamydia (Produit de la Société Savyon Diagnostics, N° de Cat. 011-01) qui est test sérologique reconnu pour déceler la présence des anticorps IgG dirigés contre Chlamydia.
La population ayant fait l'objet de l'étude comprenait des patients chez lesquels des infections dues à Chlamydia étaient suspectées ainsi que des individus sains (n=328). Les résultats sont résumés de la manière suivante :

Comparaison du test SeroELISA™ et du test IPAzyme™

SeroELISA™ / IPAzyme™	Positif	Négatif	Total
Positif	116	8	124
Négatif	10	194	204
Total	126	202	328

Concordance globale : (310/328) x 100 = 94,5%

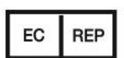
Réactions croisées

Des patients hospitalisés, infectés par des agents pathogènes: *Neisseria gonorrhea*, *Staphylococcus aureus.*, et 3 ainsi que par *Adenovirus* et *Peptostreptococcus anaerobiius* diagnostiqués par des tests sérologiques commercialisés, ont été aussi étudiés avec la SeroELISA Chlamydia. La plupart des sérums ont été trouvés négatifs, il n'a pas été détecté de réactions croisées significatives.

Bibliographie

1. **Yuan, Y., Zhang, Y. X., Watkins, N. G. and Caldwell, H.D.** (1989). Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences for the Four Variable Domains of the Major Outer Membrane Proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* Serovars. Infection and Immunity. **57:**1040-1049. Copyright 1989, American Society for Microbiology.
2. **Treharne J. D.** (1985). The community epidemiology of trachoma. Rev Infect Dis. **7:**760-763.
3. **Piura, B., Sarov, I., Sarov, B., Kleinman, D., Chaim, W. and Insler, V.** (1985). Serum IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. Eur. J. Epidemiol **1:** 110-116.
4. **Wang, S.P., Grayston, J.T., Kuo, C.C., Alexander, E.R., and Holmes, K.K.** (1977). SeroDiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection with the microimmunofluorescence test. In: Nongonoccolcal urethritis and related infection, D. Hobson and K.K. Holmes (Eds), P. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 237-248.
5. **Thompson III S. E., and Dretler R. H.** (1982). Epidemiology and Treatment of Chlamydial Infections in Pregnant Women and Infants. Review of Infectious Diseases **4:**S747
6. **Saikku P., Mattila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Ekman, M.R., Makela, P.H., and Valtonen, V**. (1988). Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infection. Lancet **II:** 983-986.

7. **Sarov, I., Kleinman, D., Cevenini R., Holcber, G., Potashnik, G. Sarov, B . and Insler, V.** (1986). Specific IgG and IgA Antibodies to Chlamydia trachomatis in Infertile Women. Int. J. Fertil 31:193-197.
8. **Csango, P.A., Sarov, B., Schiotz, H., Sarov, I**. (1988) Comparison Between Cell Culture and Serology for Detecting Chlamydia trachomatis in women seeking abortion. J. Clin. Pathol. 41:89-92.
9. **Tsunekawa, t. and Kumamoto, Y**. (1989). A Study of IgA and IgG Titers of C.trachomatis in Serum and Prostatic Secretion in Chronic Prostatitis. J. J. A. Inf. Dis. 63:130-137.
10. **Kletter, Y., Caspi. D., Yarom, M., Sarov, B., Sarov, I. And Tanay, A.** (1988) Serum IgA and IgG Antibodies Specific to Chlamydia in Patient's with Reiter's Syndrome (RS). In: Proceedings of the European Society for Chlamydia Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna. p. 170.



Obelis s.a. (European Authorized Representative Center)
Boulevard Général Wahis 53, 1030 Brussels, Belgium
Tel.: +32.2.732.59.54 Fax.: +32.2.732.60.03
e-mail: mail@obelis.net